

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-65292

(43) 公開日 平成6年(1994)3月8日

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>

識別記号

F I

C07K 13/00

ZNA 8619-4H

A01H 5/00

ZNA A 8502-2B

A01N 63/02

8517-4H

C12N 1/21

7236-4B

5/10

審査請求 未請求 請求項の数16 (全18頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平4-213886

(22) 出願日 平成4年(1992)8月11日

(71) 出願人 000001052

株式会社クボタ

大阪府大阪市浪速区敷津東一丁目2番47号

(72) 発明者 荻原 克俊

茨城県竜ヶ崎市向陽台5-6 株式会社ク

ボタ技術開発研究所つくば研究室内

(72) 発明者 南 政慶

茨城県竜ヶ崎市向陽台5-6 株式会社ク

ボタ技術開発研究所つくば研究室内

(72) 発明者 鈴木 伸和

茨城県竜ヶ崎市向陽台5-6 株式会社ク

ボタ技術開発研究所つくば研究室内

(74) 代理人 弁理士 北村 修

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 甲虫目昆虫の幼虫に対する殺虫性タンパク質、及びその殺虫性タンパク質をコードする新規DNA

(57) 【要約】

【目的】 甲虫目昆虫の幼虫に対する殺虫性タンパク質、及び、そのタンパク質をコードする新規DNAを提供すること。

【構成】 本発明の新規DNAは甲虫目昆虫の幼虫に対する殺虫性タンパク質のアミノ酸配列をコードしてなる3633の塩基配列を含んでいることを特徴とし、あるいは、前記塩基配列のうち5末端から2299番目までの塩基配列を含むように改変されたことを特徴とし、それら戦記配列を用いることにより、甲虫目昆虫の幼虫に対する殺虫性タンパク質を生産することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する甲虫目昆虫の幼虫に対する殺虫性タンパク質。

【請求項2】 配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する甲虫目昆虫の幼虫に対する殺虫性タンパク質をコードする塩基配列を含むDNA。

【請求項3】 請求項2記載のDNAの持つ塩基配列を有し、宿主細菌において発現するプラスミド。

【請求項4】 前記宿主細菌が、大腸菌、シュードモナス、バチルス・チューリングエンシス類の群の中から選ばれたものである請求項3記載のプラスミド。

【請求項5】 請求項3記載のプラスミドを有し、前記殺虫性タンパク質を生産する微生物。

【請求項6】 請求項1記載の殺虫性タンパク質を有効成分とする殺虫剤。

【請求項7】 配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する甲虫目昆虫の幼虫に対する変異体殺虫性タンパク質。

【請求項8】 配列番号1記載のアミノ酸配列において、N末端から第53番までのアミノ酸及び、第705番からC末端までのアミノ酸を欠失することによって改変されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む変異体DNA。

【請求項9】 請求項8記載の変異体DNAの塩基配列を有し、宿主細菌において発現するプラスミド。

【請求項10】 前記宿主細菌が、大腸菌、シュードモナス、バチルス・チューリングエンシス類の群の中から選ばれたものである請求項9記載のプラスミド。

【請求項11】 請求項9記載のプラスミドを有し、請求項7記載の前記変異体殺虫性タンパク質を生産する微生物。

【請求項12】 有効成分が、請求項11記載の微生物が生産する変異体殺虫性タンパク質である殺虫剤。

【請求項13】 有効成分が、請求項11記載の微生物を、前記変異体殺虫性タンパク質と共に含んだものである殺虫剤。

【請求項14】 有効成分が、前記変異体殺虫性タンパク質を含んだ状態の請求項11記載の微生物を死菌化したものである殺虫剤。

【請求項15】 請求項2記載のDNAを導入した組換え体植物。

【請求項16】 請求項8記載のDNAを導入した組換え体植物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、甲虫目昆虫の幼虫に対する殺虫性タンパク質、及びその殺虫性タンパク質をコードする新規DNAに関する。

## 【0002】

【従来の技術】従来、バチルス・チューリングエンシス・セロバー・ヤポネンシス属で知られている菌株は、鱗翅

目昆虫の幼虫に対する殺虫性タンパク質を産生するものが知られている。また、バチルス・チューリングエンシス・サンディエゴ、バチルス・チューリングエンシス・テネブリオニスの様に、ハムシの仲間、コロラドポテトビートルやゴミムシダマシの仲間チャイロコメノゴミムシダマシを殺すバチルス・チューリングエンシス菌が知られている〔例えば(Biotechnology 4, 305-308(1986); J. Appl. Ent. 104(1987), 417-424) 参照〕。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかし、ヤポネンシス属の菌株では鱗翅目昆虫の幼虫にたいする殺虫性タンパク質以外の毒素タンパク質を産生するものが知られていなかったために、鱗翅目以外の他の昆虫に対する殺虫剤には利用できなかった。また、バチルス・チューリングエンシス・サンディエゴ、バチルス・チューリングエンシス・テネブリオニスなどは、シバ、サトイモ、サツマイモ、ラッカセイ等の大害虫であるドウガネブイブイの幼虫には殺虫効果がなく、結局、特にハムシ類、ゴミムシダマシ類以外の甲虫目昆虫の幼虫に対する有効な殺虫性タンパク質は、知られておらず、そのパイオ農業を提供するのが困難であった。そこで、本発明の目的は甲虫目昆虫の幼虫に対する殺虫性タンパク質及びそのタンパク質をコードするDNAを提供することにある。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】本発明の新規DNAの塩基配列、及び、新規DNAによってコードされた殺虫性タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号1に示されるものであり、前記DNAの塩基配列の一部を欠失させてなる改変された変異体DNAの塩基配列、及び、その変異体DNAによってコードされる変異体タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号2に示されるものである。

## 【0005】

【作用】本発明の新規殺虫性タンパク質は、本新規殺虫性タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNAを単離し、それを用いて宿主菌内で生産する物である。即ち前記塩基配列を有するDNAをプラスミドに組み込み、このプラスミドにより宿主菌を形質転換し、形質転換菌を培養する事により殺虫性タンパク質を生産する物である。コロニーハイブリダイゼーションにより前記DNAの宿主内での増殖を、イムノアッセイにより前記タンパク質の生産を、生物検定により殺虫活性を、それぞれ調べる事により、生産されるタンパク質の諸性質を調査し、DNA及びタンパク質を特定することができる。

【0006】従って、バチルス・チューリングエンシス・セロバー・ヤポネンシス・ストレイン・ブイブイ (Bacillus thuringiensis serovar japonensis strain Buibu i) (以下ブイブイ菌と略称する) によらず、前記殺虫性タンパク質を、培養の容易な宿主において、生産出来るようになった。尚、前記ブイブイ菌は、微工研条寄第

3465号(FERM BP-3465)として工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている。

【0007】また、前記殺虫性タンパク質を生産可能なDNAは、その塩基配列の一部(配列番号1記載のアミノ酸配列におけるN末端から第54番目のアミノ酸から第709番目までのアミノ酸をコードする塩基配列以外の部分)を欠失させる改変を行うことにより、変異体DNAをつくる事が出来る。その改変された変異体DNAは、単離し、前記変異体DNAをプラスミドに組み込み、大腸菌等の宿主にクローニングして、発現させるとにより、前記殺虫性タンパク質よりも分子量の小さな変異体殺虫性タンパク質を生産することが可能になるものであり、かつ、この変異体DNAは、前記DNAよりも分子量の小さいものであり、一般的に形質転換に用いるDNAは、分子量が適当に小さい程、形質転換が容易であるので、より容易に、甲虫目昆虫に対する殺虫性をもつタンパク質を、生産することが可能になった。然し、709番目のアミノ酸より更にN末端側のアミノ酸を欠失する事は可能であり、前記54〜709番目のアミノ酸からなるタンパク質が最小活性単位である訳ではない。

【0008】さらに、上述の殺虫性タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNAと、そのDNAを改変してなる変異体DNAは、様々な宿主細胞に組み込むことにより、殺虫性の微生物や、殺虫性の植物を作ることが出来るものであり、且つ、前記DNA及び変異体DNAの生産する殺虫性タンパク質は、様々な形態で殺虫剤として用いることの出来るものである。結局、従来の微生物農薬では殺すことの出来なかったドウガネブイブイ等の甲虫目昆虫の幼虫を殺すことができるようになった。

【0009】

【発明の効果】従って、本発明によるDNA、及び殺虫性タンパク質を用いることにより、シバ、サトイモ、サツマイモ、ラッカセイ等の植物から害虫を除虫する際に、化学農薬を使用する場合に比し、人体に害を及ぼしにくい、バイオ農薬を提供できるようになった。

【0010】また、前記DNAをクローニングして、前記殺虫性タンパク質を生産することにより、その生産性は向上し、さらに変異体DNA、及び変異体殺虫性タンパク質を単離したことにより、尚一層前記変異体DNAのクローニングのしやすさ、及び前記変異体殺虫性タンパク質の生産性を高めることができた。

【0011】

【実施例】先ずブイブイ菌より殺虫性タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む全DNAを単離し、そのDNAを制限酵素で切断してDNAを断片とし、前記DNA断片をプラスミドに組み込み、このDNA断片を組み込んだ組換えプラスミドを用いて大腸菌を形質転換するいわゆるショットガンクローニングを行な

う。次に、形質転換された組換え体大腸菌により生産されたDNAの内、殺虫性タンパク質をコードする塩基配列を含んでいる大腸菌を、コロニーハイブリダイゼーションで検査する。更に、コロニーハイブリダイゼーションに陽性のDNAを持つ大腸菌の生産するタンパク質を、イムノアッセイにより検出する。更に、そのタンパク質の殺虫活性を、生物検定により検査する。その後、前述のコロニーハイブリダイゼーション、イムノアッセイ、生物検定の全てに陽性であったDNAの塩基配列を決定する事により、新規殺虫性タンパク質をコードするDNAを特定し、このDNAを用いて前記タンパク質を作る事が可能になった。尚、塩基配列の決定に際しては、最初に用いた制限酵素によるショットガンクローニングでは、3'末端の一部が欠失した遺伝子が得られたため、制限酵素を変え、更に、完全長の塩基配列を読みとるための操作を行った。また、上記DNAをエキソヌクレアーゼを用いて3'末端を欠失させる事により、変異体DNAを合成し、更に前記変異体DNAを用いて変異体殺虫性タンパク質を得た。

【0012】さらに、前記DNA及び前記変異体DNAによる組換えを容易にするためのカセット化DNAの合成、形質転換植物の作成、殺虫剤作成を、夫々行った。

【0013】実施例1においては、本発明の新規DNA及び新規殺虫性タンパク質を、DNAのクローニング、タンパク質のN末端の決定、コロニーハイブリダイゼーション、イムノアッセイ、生物検定、塩基配列の決定の順で説明する。実施例2においては変異体DNA及び変異体殺虫性タンパク質についての説明を行う。実施例3においてはカセット化DNAの合成、実施例4においては形質転換植物の作成の説明を行う。さらに実施例5においては実施例1〜4記載の微生物、DNA、及びタンパク質を用いた殺虫剤についての説明を行う。

【0014】【実施例1】：新規DNA、及び、新規殺虫性タンパク質

(DNAの単離及び大腸菌JM109へのクローニング) ブイブイ菌をNYS寒天培地【例えば、(Biological control 2 (1992) [Insecticidal spectrum of a novel isolate of *Bacillus thuringiensis* serovar japonensis], *Journal of Invertebrate Pathology* (1992) [Processing of delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subst. *urstaki* HD-1 and HD-73 by gut juices of various insect larvae]] 参照) に塗布して、30℃で一晩培養し、単一コロニーをかきとり、ルリア液体培地で30℃で一晩培養する。この時600nmに於ける菌培養物の光学的吸収は約OD1.5〜0.7である。一般の成書、例えば(A manual for genetic engineering: Advanced bacterial genetics eds R.W.Davis, D.Botstein, J.R.Roth, 1980 Cold Spring Harbour Laboratories, MOlecular cloning 2nd ed Sambrook, J.,

5

Fritsch, E. F., Maniatics, T.) 等に記載の方法により  
ブイブイ菌から全DNAを単離する

【0015】得られたDNAは、制限酵素EcoRIで切断  
して、EcoRI DNA切断とし、予め発現プラスミドBlue  
scriptIIKS (+) を制限酵素EcoRIで切断した切断部  
位に、T4 DNAリガーゼを用いて前記EcoRI DNA断  
片を連結し、組み換えプラスミドとした。このようにし  
て得られた組換えプラスミドのうち、約6.3 kb付近  
に泳動する物を、組換えプラスミドの候補として用いて  
大腸菌JM109株を形質転換した。組換えプラスミド  
によって形質転換を行なった前記大腸菌JM109株  
は、常法に従いアンピシリン(50 µg/ml)、IPTG  
(イソプロピルチオガラクトピラノシド)、X-Ga  
l (5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-D-  
ガラクトピラノシド) を含んだルリアブロス固体平板培  
地で一晚培養した、これら的大腸菌JM109株の内、  
EcoRI DNA断片を含むものはガラクトシダーゼを生産  
出来ないでX-Galを代謝できず、白色コロニーを生  
ずる。青変するコロニーは、EcoRI組み換えプラスミ  
ドを持たないとして、白色のコロニーのみを、EcoRI組  
み換えプラスミドを持った形質転換された組み換え体大  
腸菌JM109のコロニーとして、およそ10,000  
個得た。こうして得られた組み換え体大腸菌JM109  
は、アンピシリン(50 µg/ml)を含むルリア寒天  
培地を用いてコロニーの直径が2-3 mm位になるまで  
37℃で培養した

【0016】〈タンパク質の精製及びN末端の決定〉ブ  
イブイ菌の生産する殺虫性タンパクを[Appl. Ent Zool  
vol. 26 p485~492(1991)] 記載の方法でブイブイ菌培  
養物中から単離精製した。湿重量1 gの殺虫性結晶体を

Xaa Xaa Pro Asn Asn Gln Asn Glu Ile Ile Asp Ala Leu

【0018】〈コロニーハイブリダイゼーション〉上述  
の操作において明らかになったアミノ酸配列とブイブイ  
菌に含まれることの多いコドンとを組み合わせ、化2  
に示すような塩基配列を、コロニーハイブリダイゼー  
ションに用いるプローブとして合成した。尚、ペーリン  
ガーマンハイム社のDIGを、前記プローブに末端標識と  
して付加した。尚DIGとはディゴキシゲニンの事で、  
化学発光する物質でウリジンヌクレオチドとスペーサー  
によって結合し、酵素反応を用いて合成したプライマー  
の中に取り込むことができる。方法は、供給もとである  
ペーリンガーマンハイムバイオケミカ社の方法に従った。

【0019】

【化2】CCAAATAATCAAAATGAATATGAAAT

【0020】前述において培養した形質転換された大腸  
菌JM109株は、そのコロニーをニトロセルロース膜  
に転写した後、その転写された前記大腸菌を、常法によ  
ってアルカリ可溶化し、そのアルカリ可溶化した前記大  
腸菌と上述において合成したハイブリダイゼーション用  
プローブとのハイブリダイゼーションを行った。検出

6

pH 12の水酸化ナトリウム溶液で溶解し、50 mMト  
リス塩酸緩衝液でpH 8に調整の後、pH 8の50 mM  
トリス塩酸緩衝液に対して透析する。可溶性画分を1  
0, 000 x Gの遠心分離により回収して、DEAE  
(ジエチルアミノエチル) セファロースイオン交換体カ  
ラムを用いて分離した。遠心分離した可溶性画分をカラ  
ム(2 cm直径 x 25 cm長さ)に充填し、十分量の5  
0 mMトリス塩酸緩衝液(pH 8.0)で洗浄した後、  
200 mlの50 mMトリス塩酸緩衝液(pH 8.0)  
を用いて0~0.7 MのNaClの濃度勾配を作成し、  
連続的にイオン交換カラムに吸着したタンパク質を溶出  
した(図1)。これらを、更に再クロマトグラフィーで  
精製した(図2)。上述の操作により、前記殺虫性タン  
パク質は塩化ナトリウム濃度0.2 M付近に溶出した

(図1のP2、及び図2Bに示す)。こうして得られた  
前記殺虫性タンパク質をドデシル硫酸ナトリウム(SD  
S)-ポリアクリルアミド電気泳動(PAGE)(SD  
S 1%)により分離し、ブromフェノールブルーで染色  
してPVDF膜に転写した。こうして得られた130 k  
Daのタンパク質部分を切りとり、ABI社製自動アミ  
ノ酸配列決定機を用いて分析を行ったところ、前記殺虫  
性タンパク質のアミノ酸配列のN末端は化1に示すよう  
になっていることが判った。尚、SDS-PAGEの方法  
はどこにでもある方法、例えば、Appl. Ent. Zool. 2  
6 485-492 1991の方法などを用いる。PVDF膜への転  
写はミリポア社のイモビロンを用いてABI、ミリポア  
社などの奨める方法に従った。

【0017】

【化1】

は、プローブによる化学発光を、X線フィルムに露光す  
ることによって行った。その結果、前述の形質転換され  
た組み換え体大腸菌コロニーのうち、5個がハイブリ  
ダイゼーションした。これら5株の大腸菌は、ショット  
ガンクローニングによってブイブイ且つの全DNAの一部  
が組み込まれたものであるが、その組み込まれたDNA  
に目的とするトキシン遺伝子が存在している可能性が高  
い。

【0021】〈イムノアッセイ〉ブイブイ株培養物から  
二相分配法などにより殺虫性タンパク質結晶体を精製し  
た(Goodman, N.S., R.J. Gottfried and M.H. Rogoff (1  
967) J. Bacteriol. 94 485)。前述のようにアルカリ溶  
液で可溶化し、抗原としてウサギに免疫して抗血清を作  
製した。大腸菌を磨砕し、遠心分離の後、上清に回収さ  
れる可溶性画分に含まれる全物質を抗原として、前記の  
ように作製した抗血清を吸収したのち、イムノアッセイ  
に用いる抗体とした。尚、抗血清は、免疫グロブリン  
クラスまで精製し、パーオキシダーゼを結合した物を用い  
た。前述のコロニーハイブリダイゼーション試験に陽性

であった組み換え体大腸菌のコロニーを、ニトロセルロース膜に写しとり、さらに、それを50 $\mu$ g/mlのアムピシリンを含むルリア寒天培地上に置き、37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。さらに前記ニトロセルロース膜をはがして転写された前記組み換え体大腸菌を常法に従い、SDS及びアルカリ処理を行い溶菌、固定を行った。次に前述の処理を行った大腸菌に対し、前記イムノアッセイ用プローブを用いて抗原抗体反応を行った。抗原抗体反応の検出は、抗体が酵素反応により生産する色素によって行った。この結果コロニーハイブリダイゼーションによって陽性であった5株の大腸菌は皆、イムノアッセイでも陽性であり、タンパク質、特にトキシンタンパク質を生産している可能性が確認された。プローブの検出は、コニカ社のイムノステインシステムを用いて行なったが、感度の良い物であれば、ビオチン等を用いた物でも全く同様に用いる事が出来る。

【0022】〈生物検定〉イムノアッセイで陽性であった組み換え体大腸菌のコロニーを、ルリア液体培地で培養、集菌し、その組み換え体大腸菌を乾燥腐葉土に混入して、一齢のドウガネブイブイに与えた。前記集菌した大腸菌の混入及びその殺虫性の評価の方法は以下のとおりである。

1. 混入割合……幼虫一頭当たり、乾燥腐葉土1gに前記大腸菌を含んだ懸濁液1mlを加える。大腸菌は50ml三角フラスコで50 $\mu$ gのアムピシリンを含むシブロス10mlで2日間培養し、菌を遠心回収の後5mlの蒸留水に懸濁しそれを1ml用いた。この時回収される大腸菌は、湿重量0.3g前後である。

2. 殺虫性の評価……前記組み換え大腸菌を混入した前記乾燥腐葉土を入れたプラスチックカップに、一頭ずつ幼虫を入れて、所定時間飼育し、死亡幼虫数を全幼虫数で除した値である死亡率により評価を行う。

その結果、ハイブリダイゼーション及びイムノアッセイで陽性であった5個の前記組み換え大腸菌コロニーのうち3個が殺虫活性を示すことがわかった。

【0023】〈ウエスタンブロッティング〉生物検定で陽性の菌株を培養し、全タンパク質をアルカリ抽出してSDS-PAGE分析を行なった。泳動されたタンパク質をニトロセルロース膜に写し取り、前述した大腸菌の可溶性画分に含まれる抗原性物質で吸収した抗体を用いてウエスタンブロッティングを行なった。ハイブリダイゼーションしたタンパク質はおよそ130kDaの辺に泳動していた。

【0024】〈遺伝子の塩基配列〉コロニーハイブリダイゼーション、イムノアッセイ、及び生物検定の全ての検査に陽性であった3個の大腸菌コロニーを。ルリアブロス液体培地を用いて大量培養した。これらの大腸菌コロニーからそれぞれ組み換えプラスミドを分離し、EcoRI制限酵素で切断した後、この切断されたプラスミドをアガロースゲル電気泳動で調べると、2本のDNAのバ

ンドが検出できた。これらのうち、1本は開環状のBlue scriptIISK (+) とそのサイズが一致し、他方は、約3400bpで殺虫性タンパク質をコードする塩基配列を含むDNAであると考えられるものであった。

【0025】得られた約3400bpの前記DNAを鋳型に蛍光標識したプライマーを合成し、前記合成プライマーをアニールし、常法に従いT7-DNAポリメラーゼ、及びダイデオキシNTPを用いるダイデオキシヌクレオチド法により各種中間体を合成した。塩基配列の読み取りは、ファルマシPLKB社製の自動読取装置を用いた。この結果読み取ることのできた塩基配列は3366塩基であった。しかし、前記3366塩基の配列の中には、終止コドンが見出されなかったため、前記3366塩基が目的とするDNAの全塩基配列を、含んでいないことがわかった。

【0026】そこでブイブイ菌から分離したDNAを、制限酵素ClaIで切断して、ClaI DNA断片とし、このClaI DNA断片を、アガロースゲル電気泳動により分離した。

【0027】先にEcoRIを用いて塩基配列を読み取ることのできたEcoRI DNA断片をEcoRVで切断し、約1kbのEcoRV断片としたものをサザン解析用プローブとし、サザン解析を行った。(このサザン解析用プローブは、ブイブイ菌の遺伝子の中央よりやや5'末端側の部分に相当する。) サザン解析を行ったところ、前記サザン解析用プローブは、前述のアガロースゲル電気泳動により分離したClaI DNA断片の約6.5kbのものとハイブリダイゼーションした。

【0028】そこで前記ClaI DNA断片のうちハイブリダイゼーションした部分を取り出し、予め発現プラスミドBluescriptIISK (+) を制限酵素ClaIで切断した切断部位に、前記ClaI DNA断片を連結してClaI組み換えプラスミドを合成した。このClaI組み換えプラスミドを用いて大腸菌XLIブルーを形質転換する。この形質転換された大腸菌XLIブルーは、常法に従って培養した。この中からコロニーハイブリダイゼーション、イムノアッセイ、生物検定ともに陽性の株を選抜し、前述の大腸菌JM109株を用いた場合と同様の方法で、殺虫性タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むClaI DNA断片の塩基配列を決定した。殺虫性タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列は、配列番号1記載のように3797塩基よるなる塩基配列からなり、このうちオープンリーディングフレーム(ORF)は1149アミノ酸をコードしていることがわかった。また、前記塩基配列によりコードされるアミノ酸配列も推定でき、推定分子量は129186であることがわかった。尚、この配列番号1記載の塩基配列を含有する微生物およびプラスミドは平成4年7月13日、微工研条寄第3929号で通産省工業技術院微生物工業技術研究所に寄託した。

1157

【0029】実施例1において、大腸菌JM109株を形質転換する方法は、カルシウム法としたが、常法において形質転換可能な方法を採用すれば良く、例えば、ハナハン法、電気導入法等を用いることも可能である。

【0030】また実施例1においてはBluescriptを用いて大腸菌の形質転換を行ったが、他のプラスミドを用いて行うこともできる。

【0031】実施例1においては宿主細菌を大腸菌JM109株としたが、宿主細菌は大腸菌に限らず、シュードモナス等のグラム陰性菌、バチルス等のグラム陽性菌、カビ・酵母等の真核生物を用いることも出来る。また、全塩基配列を読みとる方法は、制限酵素を用いたショットガン法に限られない。実際完全長でない遺伝子を含んでいたEcoRI断片をPCR法によって3'末端側へ延長して同じように全塩基配列を読む事もできる。例えば以下のような読み方が出来る。実施例1において3366塩基まで読んだEcoRI DNA断片の下流4700番目近傍及び2037番目近傍にNdeI制限酵素認識サイトがあるのが分かっている。遺伝子をNdeIで切りだしその断片の環状化を行った。NdeI制限酵素認識サイトから3366番目の塩基までの間では、2746番目付近の塩基配列にAccI制限酵素認識サイトがある事は分かっている。自己環状化した遺伝子を、AccI制限酵素で切断して開環した。こうして開環した直鎖状DNAの両末端はAccI制限酵素認識サイトになっている。次に、このAccI制限酵素認識サイト近傍の既知のDNA配列である5'末端から2974番目から3003番目までの30塩基からなる塩基配列、及び、アンチセンス鎖のプライマーとして2194番目から2165番目までの30塩基をプライマーとして合成した（以下化3及び化4に示す）。これらをプライマーにPCR法でDNA鎖を合成する。その合成鎖の塩基配列を、常法に従いダイデオキシ法を用いて自動塩基配列読みとり装置で読む。結果、この配列はAccI制限酵素認識サイトを含む形でAccI制限酵素認識サイトの5'末端側と一部重複しながら、NdeI制限酵素認識サイトまで至り、その途中に期待どおり終止コドンが見出されたことにより、殺虫性タンパク質のアミノ酸配列をコードする全塩基配列が読めた。

【0032】

【化3】5'-CAAGAACAACAATGGCAAGACAAAATGGCA-3'

【0033】

【化4】3'-GCAATAAACTTCGTCTTCTTCTGGATCTAC-5'

【0034】〔実施例2〕：殺虫性タンパク質を用いた殺虫剤

ブイブイ菌を培養して結晶タンパク質を精製した。結晶タンパク質を含む結晶は該微生物が生産しコガネムシ等の甲虫目昆虫の幼虫を殺虫する。この結晶をアルカリ処理すると結晶タンパク質は溶解し、常法に従いSDS-PAGE分析を行なう事が出来る。結晶タンパク質の主要成分は、130kDaである。この可溶化したタン

パク質をイオン交換樹脂を用いて精製すると、二つの活性成分が分離される。SDS-PAGE分析すると、分子量は約130kDa及び65kDaであった。65kDaのタンパク質の存在量は、130kDaに比べ少ない。ふたつのタンパク質のN末端のアミノ酸分析をしたところ、分析結果は130kDaタンパク質は配列番号1に示した塩基配列から類推できるアミノ酸配列と一致している。つまり130kDaの場合は全く修飾されずに抽出された事を意味している。一方65kDaの配列を同じく配列番号1に示した全アミノ酸配列と比較すると、65kDaのN末端のアミノ酸配列は、130kDaのアミノ酸配列の54番目から始まるアミノ酸配列と一致している。したがって精製の過程或いは、可溶性の際に130kDaのタンパク質がプロセスされて生じた物と思える。これは殺虫活性を示し、ドウガネブイブイを殺虫した。両タンパク質は、DEAE等の陰イオン交換樹脂に吸着して、NaCl等を用いてイオン強度を連続的に或いは不連続的にあげていく事により容易に夾雑物と分別する事ができる（図1、2参照）。このようにして精製した130kDa或いは65kDaの精製タンパク質は、殺虫剤の有効成分として製剤化に用いる事ができる。施用の方法は対象植物の根の周辺に注入する、堆肥と共に根の周辺に施肥する植物根の周辺の地際に散布するなどの方法をとれる。前記タンパク質は容易に環境中で微生物により分解されるので、それを防ぐために種々のポリマーでコーティングする事もできる。尚、前記殺虫剤は例えば甲虫目アオドウガネ (*Anomala albopilosa*)、サクラコガネ (*Anomala daimiana*)、コガネムシ (*Minela splendens*)、マメコガネ (*Popillia japonica*)、セマダラコガネ (*Blitopertha orientalis*)、ヒメコガネ (*Anomala rufocuprea* Motschulsky)、チビサクラコガネ (*Anomala schoenfeldti* Ohaus) などの殺虫に有効である。

【0035】〔実施例3〕：変異体DNA及び変異体タンパク質

実施例1において明らかになった殺虫性タンパク質は、分子量約13万であり、甲虫目昆虫の幼虫の腸の中で酵素分解によりプロセスされ、分子量約6万の毒素に変換されるプロトキシンと呼ばれるものである。このような機構は [Microbiol. Rev. 53, 242-255 (1989)] 等 に示されるように、殺虫性タンパク質に共通にみられるものであり、前記殺虫性タンパク質のC末端側の約半分は、殺虫性の活性には関与していないものと考えられている。実際ブイブイ株の殺虫性タンパク質の場合も、図1および図2に示したように130kDaから派生した65kDaの殺虫性タンパク質（図1のP1及び図2のかを示す）も精製され、このものはドウガネブイブイの幼虫に対して殺虫活性を示した（図2）。

【0036】また、バチルス・チューリンゲンシス・セロパー・クルスタキエーHD-1のcryIA(a)遺伝子

11

を用いて欠失変異株を作った実験では、645番目のアミノ酸をもっている場合は活性があり、さらに645番目から603番目までのアミノ酸をC-末端側から削った場合は、活性を失うことが知られている〔(J. Biol. Chem. 260 6273-6280)参照〕。従って、大腸菌等の宿主細胞を殺虫性タンパク質をコードするDNAを用いて形質転換する場合は、実施例1により明らかになったDNAをそのまま宿主細胞に形質転換しなくとも、そのDNAを殺虫活性を失わないように欠失させることにより改変を行って、変異体DNAをつくり、その変異体DNAを用いて宿主細胞を形質転換することができる。

【0037】そこで、実施例1において、クローニングしたDNAを用い前記DNAの3'末端をエキソヌクラーゼで分解削除して、DNAを5'末端から2300番以後の塩基配列を削除して変異体DNAを作成し、前記変異体DNAを、大腸菌を用いてクローニングした。前記変異体DNAを組み込んで10〜2日培養した組み換え大腸菌を、蒸留水で洗浄の後、実施例1と同様の方法で生物検定を行って殺虫活性を調べたところ前記変異体DNAによって生産される変異体殺虫性タンパク質に、殺虫活性がみられることがわかった。

【0038】以下、配列番号2に、欠失DNA変異体の塩基配列および変異体タンパク質のアミノ酸配列を示す。

【0039】実施例1の図1および図2に示したように65kDaの殺虫性タンパク質も結晶性タンパク質から精製された。この精製された殺虫性タンパク質は、SDS-PAGEに於いて単一のバンドを示した。この単一のバンドを示した65kDaの殺虫性タンパク質を常法に従ってPVDF膜に転写し、相当する部分を切りとりABI社製自動アミノ酸配列決定機によりN末端を決定した。この65kDaの殺虫性タンパク質のN末端のアミノ酸配列は、実施例1で単離した分子量130kDaの殺虫性タンパク質のN末端から54番目のアミノ酸から始まるアミノ酸配列に等しく、配列番号1の配列に由来している事は明らかである。また、前記分子量130kDaの殺虫性タンパク質のN末端から53番目までのアミノ酸および、705番目からC末端までのアミノ酸が構成する部分は、殺虫性の発現に必ずしも必要でない事が示された事になる。

【0040】〔実施例4〕：大腸菌、シュドモナス、

5'-GGATCCATGAGTCCA-----GGCCGCTCTCTGCATTGCTT-3'  
3'-CCTAGGTACTCAGGT-----CCGCCGAGAGACGTAAACGA A-5'

【0045】前記2本鎖DNAを、制限酵素BamHIと制限酵素AciIとを用いて2重分解することにより、BamHIサイトを5'末端に、AciIサイトを3'末端に持ったトキシシンDNAの断片を得る事ができる。以下に化7の2本鎖DNAより作ったカセット化DNAを化8として示す。

【0046】

12

パチルス等で発現するようにしたDNAのカセット化大腸菌、シュドモナス、パチルス等には遺伝子工学上あるいは農業、工業の実際上有益な種々の菌が含まれる。これらの菌で増殖し、発現するプラスミドに自由に挿入する事のできるように、前述のトキシシンDNAをカセット化する事が容易にできる。殺虫性タンパク質をコードするDNAには、BamHIサイトが存在していないので、市販されている多くのプラスミドのマルチクローニングサイトに存在するBamHIサイトを開始コドンATGのすぐ上流に導入すれば、容易にBamHIサイトでトキシシンDNAを種々のプラスミドに導入する事ができる。またそのプラスミドが大腸菌とシュドモナスの両方で、或いはシュドモナスとパチルスの両方などで働くORIをもち、カセットの両端が該微生物中で働くプロモータに結合し、且つ、翻訳を希望点で中止できる物とすれば、ブイブイ菌の遺伝子を持ったシャトルベクター、或いは、同時に発現ベクターを構築することができる。具体的カセット化DNAの合成法を以下に示す。DNA合成機を用いて化5に示すオリゴヌクレオチドを合成する。これは、GGATCCというBamHI制限酵素認識サイトに、ATGAGTCCAATというブイブイ菌遺伝子の翻訳開始点の最初の12塩基を連結した物である。前記オリゴヌクレオチドは、PCR法でDNA鎖を合成する場合のセンス鎖のプライマーとして使用できる。一方アンチセンス鎖のプライマーとしては、遺伝子のORF内の794番目のAciIサイト、555番目のBclIサイトなどのORF内に1箇所だけにあるような制限酵素認識サイトを目印にして、前記制限酵素認識サイトより少し3'末端側の塩基配列を用いればよく、合成機でAciI制限酵素認識サイトの3'末端側の塩基配列である化6に示される塩基配列を、合成してアンチセンスプライマーとして用いることができる。

【0041】

【化5】GGATCCATGAGTCCAAT

【0042】

【化6】AGACGTAAACGAACATT

【0043】PCR反応の結果、次のような2本鎖DNAが合成される。以下化7に、PCR法により合成された2本鎖DNAを示す。

【0044】

【化7】

【化8】

5'-GATCCATGAGT---GGC  
GTACTCA---CCGCC

【0047】一方すでにクローニングしてあるEcoRI断片をAciIサイトで切断し、PCR法で合成した化8記載のDNA鎖をT4DNAリガーゼを用いて結合し、5'末端にBamHIサイトを付加したトキシシンDNAを得る。



13

次には全く同じ原理によって、適当な制限酵素サイトを終結コドンのすぐ下流に挿入する。下流にのける制限酵素サイトは、例えばAccIII, Bsa I、濃度Not I等のORF内に存在しないサイトが都合良い。例えばセンス鎖のプライマーとしては、およそ790番近傍のAci Iのすぐ上流の配列化9に示した物などがよい。

【0048】

【化9】ACCCACATATGCACAGGCCGCTCT

【0049】アンチセンス鎖のプライマーは、終止コドンのすぐ5'側末端側の塩基配列であるAAG TGA---TAGに10  
AccIIIの認識サイトであるAGGCCTの配列を結合した化10に示す塩基配列を用いる。PCR法による合成の結果、化11に示す2本鎖DNAが合成される。

【0050】

【化10】TTCACATAAGTTGTATCAGGCCT

【0051】

【化11】

-----AAGTGTATTCAACATAGTCCGGA

-TTCACATAAGTTGTATCAGGCCT

【0052】前記2本鎖DNA、制限酵素Aci I、及び20  
ccIIIで2重分解し、サイトの開裂した化12に示すDNA鎖を得る。

【0053】

【化12】

CGCCTCT---AAGTGTATTCAACATAGT

GAGA---TTCACATAAGTTGTATCAAGGCC

【0054】これを先に、5'末端の上流に制限酵素認識30  
サイトBamHIを導入したトキシンDNAの断片とAci I制限酵素認識サイトで連結する。このようにしてDNAの両端に意図する制限酵素認識サイトを持ったDNAのカセット化断片を合成できる。本実施例の場合、5'末端にBamHI、3'末端にAccIIIの各サイトを持つトキシンDNAが合成できる。市販のマルチクローニングサイトを改良し、AccIIIの各サイトを持つトキシンDNAが合成できる。市販のマルチクローニングサイトを改良し、AccIII等他の目的にかなったサイトを導入する事は出来るので、ORF内にただ一つ存在するようなサイトでカセット化する事も容易である。トキシンDNAの両端に制限酵素サイトを持ったカセットとは、容易に様々なプラスミドに挿入する事ができる物であり、例えば、実施例40  
4に於いてDNAのカセット化断片は、約130kDaの分子量の殺虫性タンパク質をコードする塩基配列を用いて合成したが、実施例3に於いて合成した約65kDaの分子量の殺虫性タンパク質をコードする塩基配列を用いて合成しても良い。この場合、2300番近傍の制限酵素に認識サイト、例えばMse I等はDNA内に多数存在するので、煩雑な操作が必要になり、HindIII, Bgl I, HaeII等の制限酵素認識サイトを、切断末端につづく3'末端側に付加するとよい。シュードモナスで増殖するプラスミドで、バチルスで増殖するpBD9等のBamHIサ50

14

イトに挿入できる。また、大腸菌での増殖にはプラスミドとして、pBR322, pUC18等を用いる事ができる。このようにして完全長の遺伝子、或いは活性を損なわない程度に欠失する改変を行った遺伝子を含んだ大腸菌、シュードモナス、バチルス等で発現可能なベクターを構築できる。用いるベクターは、大腸菌だけで増殖するという必要はなく、大腸菌と、シュードモナス、大腸菌とバチルスなどの複数の宿主において増殖するシャトルベクターでもよい。つまり、各々の宿主に対応するORIを用いて常法に従ってシャトルベクターを構築する事は十分にできる。実施例3において、プライマーの塩基配列にAci Iサイト近傍の塩基配列を用いたが、こうすることにより、Aci IサイトがORF内に1箇所しかないので切断後の断片の特定が容易になり、またPCR法による合成を行う場合に、確実に合成できる程良い長さであるという利点があるものの他の制限酵素認識サイトを選んでも良く合成法もPCR法に限られるものではないが、挿入するサイトはORF内に少ないもの、できれば一つしかないサイトが良いといえる。

【0055】(実施例5)：形質転換植物の作成

130kDaの殺虫性タンパク質をコードしている遺伝子は、いままで発見されたその殆どが、5箇所の保存された領域を持っている〔(Hofte and Whiteley Bactriol Rev (1989))参照〕。ブイブイ菌の遺伝子にも5箇所の保存領域が発見できた(図3)。それらは配列表1の760-849, 910-1110, 1669-1815, 1885-1914, 2128-2163番の塩基配列に相当する領域であり、これらを順にブロック1, 2, ~5とする。1987年に3つの論文(Plant Physiol. 85 1103-1109 (1987), Bio/Technology 5 807-813 (1987), Nature 328 33-37 (1987))が形質転換植物について発表されたが、いずれも、トキシンタンパク質の半分の活性部分をコードする塩基配列を挿入した物で、全領域を用いた場合は、いずれも培養細胞でネクロシスを起こして、形質転換物質を得ることが出来なかった。常法に従って(例えば、Cell 11 263-271 1977, Cell 19 729-739 (1980))、トキシンDNA或いは活性を失っていない半分のトキシンDNAを、アグロバクテリウムのT-DNAをベクターに用いたプラスミド系に挿入する。パーティクルガン、エレクトロポレーション、リボソーム法などの物理的方法によってこのプラスミドを植物培養細胞に導入し、変異体DNAを持つ形質転換細胞を作成する。この培養細胞から植物を再生し、前記変異体DNAを持った組換え植物を作出できる。ベクター系としては、植物と微生物のシャトルベクター系を用いる事もできる。この時は、おそらく前記DNAを持ったこのシャトルベクター系は、宿主植物細胞中でプラスミドとして存在すると思われる。これはたとえばメンデル遺伝しないため、一代限りの形質転換植物の作成に適している。T-DNAに挿入した遺伝子断片は、植物細胞中で発現するように構築した該遺伝子を、例えばCaMVの



15

35Sプロモータのすぐ3'末端側に連結した。挿入した遺伝子は、配列番号1の塩基配列5'末端第1番目から、第2299番目までを用いた。末端を第2299番目としたことは、ブロック5を含む様に改良を行ったものである。終止コドンの3'末端側には、植物で働くノバリン合成酵素(nos)のターミネータを結合した。この方法によって、双子葉、単子葉を問わず、当該遺伝子を持ったコメ、ムギ、トウモロコシ、ピーナッツ、ダイズ、ジャガイモ、サトイモ、ニンジン、カーネーション等数多くの形質転換植物を作る事が出来る。もし、CaMBの

【0056】〔実施例6〕：形質転換微生物の生産するタンパク質を用いた殺虫剤  
形質転換微生物の生産するタンパク質は、コガネムシ類の幼虫を殺虫する事が出来る。培養した培養物を、遠心分離などを用いて分離回収し、洗浄の後製剤の有効成分として用いることが出来る。製剤は、粉剤、液剤等形態

16

を問わない。また微生物が自己分解を起こす前に培養を停止して、酢酸などの化学物質によって殺虫活性を損なう事なく殺菌し、細菌内に殺虫性タンパク質を閉じ込めた物を、製剤の有効成分として用いる事が出来る。これらの製剤の施用方法は、対象植物の根の周辺に注入する、堆肥と共に根の周辺に施肥する植物根の周辺の地際に散布するなどの方法をとれる。

【0057】

【配列表】

10 配列番号 : 1

配列の長さ : 3797

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源

生物名 : バチルス・チューリンゲンシス : セロバール・ヤポネンシス (Bacillus thuringiensis serovar japonensis)

20 株名 : Bt101 (Baiter)

```

AATTCTAATG ACACAGTAGA ATATTTTAA AATAAGATG GAAGGGGAA TATGAAAAA 60
ATATAATCAT AAGAGTCATA CAAAAAGATT GTATGTTAAA AAAAAAAAT CCTGTAGGAA 120
TAGCGGTTTA AAAGCAATCA TTTGAAAAGA TAGTTATATT AAATTGTATG TATAGGGGCA 180
AAAAAG ATG AGT CCA AAT AAT CAA AAT GAG TAT GAA ATT ATA GAT GCT 228
Met Ser Pro Asn Asn Gln Asn Glu Tyr Glu Ile Ile Asp Ala
      1          5          10
TTA TCA CCC ACT TCT GTA TCC GAT AAT TCT ATT AGA TAT CCT TTA GCA 276
Leu Ser Pro Thr Ser Val Ser Asp Asn Ser Ile Arg Tyr Pro Leu Ala
      15          20          25          30
AAC GAT CAA ACG AAC ACA TTA CAA AAC ATG AAT TAT AAA GAT TAT CTG 324
Asn Asp Gln Thr Asn Thr Leu Gln Asn Met Asn Tyr Lys Asp Tyr Leu
      35          40          45
AAA ATG ACC GAA TCA ACA AAT GCT GAA TTG TCT CGA AAT CCC GGG ACA 372
Lys Met Thr Glu Ser Thr Asn Ala Glu Leu Ser Arg Asn Pro Gly Thr
      50          55          60
TTT ATT AGT GCG CAG GAT GCG GTT GGA ACT GGA ATT GAT ATT GTT AGT 420
Phe Ile Ser Ala Gln Asp Ala Val Gly Thr Gly Ile Asp Ile Val Ser
      65          70          75
ACT ATA ATA AGT GGT TTA GGG ATT CCA GTG CTT GGG GAA GTC TTC TCA 468
Thr Ile Ile Ser Gly Leu Gly Ile Pro Val Leu Gly Glu Val Phe Ser
      80          85          90
ATT CTG GGT TCA TTA ATT GGC TTA TTG TGG CCG TCA AAT AAT GAA AAT 516
Ile Leu Gly Ser Leu Ile Gly Leu Leu Trp Pro Ser Asn Asn Glu Asn
      95          100          105          110
GTA TGG CAA ATA TTT ATG AAT CGA GTG GAA GAG CTA ATT GAT CAA AAA 564
Val Trp Gln Ile Phe Met Asn Arg Val Glu Glu Leu Ile Asp Gln Lys
      115          120          125
ATA TTA GAT TCT GTA AGA TCA AGA GCC ATT GCA GAT TTA GCT AAT TCT 612
Ile Leu Asp Ser Val Arg Ser Arg Ala Ile Ala Asp Leu Ala Asn Ser

```

17	18
130	135
AGA ATA GCT GTA GAG TAC TAT CAA AAT GCA CTT GAA GAC TGG AGA AAA	660
Arg Ile Ala Val Glu Tyr Tyr Gln Asn Ala Leu Glu Asp Trp Arg Lys	
145	150
AAC CCA CAC AGT ACA CGA AGC GCA GCA CTT GTA AAG GAA AGA TTT GGA	708
Asn Pro His Ser Thr Arg Ser Ala Ala Leu Val Lys Glu Arg Phe Gly	
160	165
AAT GCA GAA GCA ATT TTA CGT ACT AAC ATG GGT TCA TTT TCT CAA ACG	756
Asn Ala Glu Ala Ile Leu Arg Thr Asn Met Gly Ser Phe Ser Gln Thr	
175	180
AAT TAT GAG ACT CCA CTC TTA CCC ACA TAT GCA CAG GCC GCC TCT CTG	804
Asn Tyr Glu Thr Pro Leu Leu Pro Thr Tyr Ala Gln Ala Ala Ser Leu	
195	200
CAT TTG CTT GTA ATG AGG GAT GTT CAA ATT TAC GGG AAG GAA TGG GGA	852
His Leu Leu Val Met Arg Asp Val Gln Ile Tyr Gly Lys Glu Trp Gly	
210	215
TAT CCT CAA AAT GAT ATT GAC CTA TTT TAT AAA GAA CAA GTA TCT TAT	900
Tyr Pro Gln Asn Asp Ile Asp Leu Phe Tyr Lys Glu Gln Val Ser Tyr	
225	230
ATG GCT AGA TAT TCA GAT CAT TGC GTC CAA TGG TAC AAT GCT GGT TTA	948
Thr Ala Arg Tyr Ser Asp His Cys Val Gln Trp Tyr Asn Ala Gly Leu	
240	245
AAT AAA TTA AGA GGA ACG GGT GCT AAG CAA TGG GTG GAT TAT AAT CGT	996
Asn Lys Leu Arg Gly Thr Gly Ala Lys Gln Trp Val Asp Tyr Asn Arg	
255	260
TTC CGA AGA GAA ATG AAT GTG ATG GTA TTG GAT CTA GTT GCA TTA TTT	1044
Phe Arg Arg Glu Met Asn Val Met Val Leu Asp Leu Val Ala Leu Phe	
275	280
CCA AAC TAC GAT GCG CGT ATA TAT CCA CTG GAA ACA AAT GCA GAA CTT	1092
Pro Asn Tyr Asp Ala Arg Ile Tyr Pro Leu Glu Thr Asn Ala Glu Leu	
290	295
ACA AGA GAA ATT TTC ACA GAT CCT GTT GGA AGT TAC GTA ACT GGA CAA	1140
Thr Arg Glu Ile Phe Thr Asp Pro Val Gly Ser Tyr Val Thr Gly Gln	
305	310
TCG AGT ACC CTT ATA TCT TGG TAC GAT ATG ATT CCA GCA GCT CTT CCT	1188
Ser Ser Thr Leu Ile Ser Trp Tyr Asp Met Ile Pro Ala Ala Leu Pro	
320	325
TCA TTT TCA ACG CTC GAG AAC CTA CTT AGA AAA CCT GAT TTC TTT ACT	1236
Ser Phe Ser Thr Leu Glu Asn Leu Leu Arg Lys Pro Asp Phe Phe Thr	
335	340
TTG CTG CAA GAA ATT AGA ATG TAT ACA AGT TTT AGA CAA AAC GGT ACG	1284
Leu Leu Gln Glu Ile Arg Met Tyr Thr Ser Phe Arg Gln Asn Gly Thr	
355	360
ATT GAA TAT TAT AAT TAT TGG GGA GGA CAA AGG TTA ACC CTT TCT TAT	1332
Ile Glu Tyr Tyr Asn Tyr Trp Gly Gly Gln Arg Leu Thr Leu Ser Tyr	
370	375
ATC TAT GGT TCC TCA TTC AAT AAA TAT AGT GGG GTT CTT GCC GGT GCT	1380
Ile Tyr Gly Ser Ser Phe Asn Lys Tyr Ser Gly Val Leu Ala Gly Ala	
385	390
GAG GAT ATT ATT CCT GTG GGT CAA AAT GAT ATT TAC AGA GTT GTA TGG	1428

19	20
Glu Asp Ile Ile Pro Val Gly Gln Asn Asp Ile Tyr Arg Val Val Trp	
400	405 410
ACT TAT ATA GGA AGG TAC ACG AAT AGT CTG CTA GGA GTA AAT CCA GTT	1476
Thr Tyr Ile Gly Arg Tyr Thr Asn Ser Leu Leu Gly Val Asn Pro Val	
415	420 425 430
ACT TTT TAC TTC AGT AAT AAT ACA CAA AAA ACT TAT TCG AAG CCA AAA	1524
Thr Phe Tyr Phe Ser Asn Asn Thr Gln Lys Thr Tyr Ser Lys Pro Lys	
435	440 445
CAA TTC GCG GGT GGA ATA AAA ACA ATT GAT TCC GGC GAA GAA TTA ACT	1572
Gln Phe Ala Gly Gly Ile Lys Thr Ile Asp Ser Gly Glu Glu Leu Thr	
450	455 460
TAC GAA AAT TAT CAA TCT TAT AGT CAC AGG GTA AGT TAC ATT ACA TCT	1620
Tyr Glu Asn Tyr Gln Ser Tyr Ser His Arg Val Ser Tyr Ile Thr Ser	
465	470 475
TTT GAA ATA AAA AGT ACC GGT GGT ACA GTA TTA GGA GTA GTT CCT ATA	1668
Phe Glu Ile Lys Ser Thr Gly Gly Thr Val Leu Gly Val Val Pro Ile	
180	185 190
TTT GGT TGG ACG CAT AGT AGT GCC AGT CGC AAT AAC TTT ATT TAC GCA	1716
Phe Gly Trp Thr His Ser Ser Ala Ser Arg Asn Asn Phe Ile Tyr Ala	
195	200 205 210
ACA AAA ATC TCA CAA ATC CCA ATC AAT AAA GCA AGT AGA ACT AGC GGT	1761
Thr Lys Ile Ser Gln Ile Pro Ile Asn Lys Ala Ser Arg Thr Ser Gly	
215	220 225
GGA GCG GTT TGG AAT TTC CAA GAA GGT CTA TAT AAT GGA GGA CCT GTA	1812
Gly Ala Val Trp Asn Phe Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Gly Gly Pro Val	
230	235 240
ATG AAA TTA TCT GGG TCT GGT TCC CAA GTA ATA AAC TTA AGG GTC GCA	1860
Met Lys Leu Ser Gly Ser Gly Ser Gln Val Ile Asn Leu Arg Val Ala	
245	250 255
ACA GAT GCA AAG GGA GCA AGT CAA AGA TAT CGT ATT AGA ATC AGA TAT	1908
Thr Asp Ala Lys Gly Ala Ser Gln Arg Tyr Arg Ile Arg Ile Arg Tyr	
260	265 270
GCC TCT GAT AGA GCG GGT AAA TTT ACG ATA TCT TCC AGA TCT CCA GAG	1956
Ala Ser Asp Arg Ala Gly Lys Phe Thr Ile Ser Ser Arg Ser Pro Glu	
275	280 285 290
AAT CCT GCA ACC TAT TCA GCT TCT ATT GCT TAT ACA AAT ACT ATG TCT	2004
Asn Pro Ala Thr Tyr Ser Ala Ser Ile Ala Tyr Thr Asn Thr Met Ser	
295	300 305 310
ACA AAT GCT TCT CTA ACG TAT AGT ACT TTT GCA TAT GCA GAA TCT GGC	2052
Thr Asn Ala Ser Leu Thr Tyr Ser Thr Phe Ala Tyr Ala Glu Ser Gly	
315	320 325
CCT ATA AAC TTA GGG ATT TCG GGA AGT TCA AGG ACT TTT GAT ATA TCT	2100
Pro Ile Asn Leu Gly Ile Ser Gly Ser Ser Arg Thr Phe Asp Ile Ser	
330	335 340
ATT ACA AAA GAA GCA GGT GCT GCT AAC CTT TAT ATT GAT AGA ATT GAA	2148
Ile Thr Lys Glu Ala Gly Ala Ala Asn Leu Tyr Ile Asp Arg Ile Glu	
345	350
TTT ATT CCA GTT AAT ACG TTA TTT GAA GCA GAA GAA GAC CTA GAT GTG	2196
Phe Ile Pro Val Asn Thr Leu Phe Glu Ala Glu Glu Asp Leu Asp Val	
355	360 365 370
GCA AAG AAA GCT GTG AAT GGC TTG TTT ACG AAT GAA AAA GAT GCC TTA	2244

21	22
Ala Lys Lys Ala Val Asn Gly Leu Phe Thr Asn Glu Lys Asp Ala Leu	
675	680 685
CAG ACA AGT GTA ACG GAT TAT CAA GTC AAT CAA GCG GCA AAC TTA ATA	2292
Gln Thr Ser Val Thr Asp Tyr Gln Val Asn Gln Ala Ala Asn Leu Ile	
690	695 700
GAA TGC CTA TCC GAT GAG TTA TAC CCA AAT GAA AAA CGA ATG TTA TGG	2340
Glu Cys Leu Ser Asp Glu Leu Tyr Pro Asn Glu Lys Arg Met Leu Trp	
705	710 715
GAT GCA GTG AAA GAG GCG AAA CGA CTT GTT CAG GCA CGT AAC TTA CTC	2388
Asp Ala Val Lys Glu Ala Lys Arg Leu Val Gln Ala Arg Asn Leu Leu	
720	725 730
CAA GAT ACA GGC TTT AAT AGG ATT AAT GGA GAA AAC GGA TGG ACG GGA	2436
Gln Asp Thr Gly Phe Asn Arg Ile Asn Gly Glu Asn Gly Trp Thr Gly	
735	740 745 750
AGT ACG GGA ATC GAG GTT GTG GAA GGA GAT GTT CTG TTT AAA GAT CGT	2484
755	760 765
TCG CTT CGT TTG ACA AGT GCG AGA GAG ATT GAT ACA GAA ACA TAT CCA	2532
Ser Leu Arg Leu Thr Ser Ala Arg Glu Ile Asp Thr Glu Thr Tyr Pro	
770	775 780
ACG TAT CTC TAT CAA CAA AAA GAT GAA TCG CTT TTA AAA CCA TAT TTA	2580
Thr Tyr Leu Tyr Gln Gln Ile Asp Glu Ser Leu Leu Lys Pro Tyr Thr	
785	790 795
AGA TAT AAA CTA AAA GGT TTT ATA GGA AGT AGT CAA GAT TTA GAG ATT	2628
Arg Tyr Lys Leu Lys Gly Phe Ile Gly Ser Ser Gln Asp Leu Glu Ile	
800	805 810
AAA TTA ATA CGT CAT CGG GCA AAT CAA ATC GTC AAA AAT GTA CCA GAT	2676
Lys Leu Ile Arg His Arg Ala Asn Gln Ile Val Lys Asn Val Pro Asp	
815	820 825 830
AAT CTC TTG CCA GAT GTA CGC CCT GTC AAT TCT TGT GGT GGA GTC GAT	2724
Asn Leu Leu Pro Asp Val Arg Pro Val Asn Ser Cys Gly Gly Val Asp	
835	840 845
CGC TGC AGT GAA CAA CAG TAT GTA GAC GCG AAT TTA GCA CTC GAA AAC	2772
Arg Cys Ser Glu Gln Gln Tyr Val Asp Ala Asn Leu Ala Leu Glu Asn	
850	855 860
AAT GGA GAA AAT GGA AAT ATG TCT TCT GAT TCC CAT GCA TTT TCT TTC	2820
Asn Gly Glu Asn Gly Asn Met Ser Ser Asp Ser His Ala Phe Ser Phe	
865	870 875
CAT ATT GAT ACG GGT GAA ATA GAT TTG AAT GAA AAT ACA GGA ATT TGG	2868
His Ile Asp Thr Gly Glu Ile Asp Leu Asn Glu Asn Thr Gly Ile Trp	
880	885 890
ATC GTA TTT AAA ATT CCG ACA ACA AAT GGA AAC GCA ACA CTA GGA AAT	2916
Ile Val Phe Lys Ile Pro Thr Thr Asn Gly Asn Ala Thr Leu Gly Asn	
895	900 905 910
CTT GAA TTT GTA GAA GAG GGG CCA TTG TCA GGG GAA ACA TTA GAA TGG	2964
Leu Glu Phe Val Glu Glu Gly Pro Leu Ser Gly Glu Thr Leu Glu Trp	
915	920 925
GCC CAA CAA CAA GAA CAA CAA TGG CAA GAC AAA ATG GCA AGA AAA CGT	3012
Ala Gln Gln Gln Glu Gln Gln Trp Gln Asp Lys Met Ala Arg Lys Arg	
930	935 940
GCA GCA TCA GAA AAA ACA TAT TAT GCA GCA AAG CAA GCC ATT GAT CGT	3060

23 24

Ala Ala Ser Glu Lys Thr Tyr Tyr Ala Ala Lys Gln Ala Ile Asp Arg  
 945 950 955

TTA TTC GCA GAT TAT CAA GAC CAA AAA CTT AAT TCT GGT GTA GAA ATG 3108  
 Leu Phe Ala Asp Tyr Gln Asp Gln Lys Leu Asn Ser Gly Val Glu Met

960 965 970

TCA GAT TTG TTG GCA GCC CAA AAC CTT GTA CAG TCC ATT CCT TAC GTA 3156  
 Ser Asp Leu Leu Ala Ala Gln Asn Leu Val Gln Ser Ile Pro Tyr Val

975 980 985 990

TAT AAT GAT GCG TTA CCG GAA ATC CCT GGA ATG AAC TAT ACG AGT TTT 3204  
 Tyr Asn Asp Ala Leu Pro Glu Ile Pro Gly Met Asn Tyr Thr Ser Phe

995 1000 1005

ACA GAG TTA ACA AAT AGA CTC CAA CAA GCA TGG AAT TTG TAT GAT CTT 3252  
 Thr Glu Leu Thr Asn Arg Leu Gln Gln Ala Trp Asn Leu Tyr Asp Leu

1010 1015 1020

CAA AAC GCT ATA CCA AAT GGA GAT TTT CGA AAT GGA TTA AGT AAT TGG 3300  
 Gln Asn Ala Ile Pro Asn Gly Asp Phe Arg Asn Gly Leu Ser Asn Trp

1025 1030 1035

AAT GCA ACA TCA GAT GTA AAT GTG CAA CAA CTA AGC GAT ACA TCT GTC 3348  
 Asn Ala Thr Ser Asp Val Asn Val Gln Gln Leu Ser Asp Thr Ser Val

1040 1045 1050

GTT GTC AAT CCA AAC TGG AAT TCT CAA GTG TCA CAA CAA TTT ACA GTT 3396  
 Leu Val Ile Pro Asn Trp Asn Ser Gln Val Ser Gln Gln Phe Thr Val

CAA CCG AAT TAT AGA TAT GTG TTA CCG GTC ACA CCG AGA AAA GAG GGA 3444  
 Gln Pro Asn Tyr Arg Tyr Val Leu Arg Val Thr Ala Arg Lys Glu Gly

1075 1080 1085

GTA GGA GAC GGA TAT GTG ATC ATC CGT GAT GGT GCA AAT CAG ACA GAA 3492  
 Val Gly Asp Gly Tyr Val Ile Ile Arg Asp Gly Ala Asn Gln Thr Glu

1090 1095 1100

ACA CTC ACA TTT AAT ATA TGT GAT GAT GAT ACA GGT GTT TTA TCT ACT 3540  
 Thr Leu Thr Phe Asn Ile Cys Asp Asp Asp Thr Gly Val Leu Ser Thr

1105 1110 1115

GAT CAA ACT AGC TAT ATC ACA AAA ACA GTG GAA TTC ACT CCA TCT ACA 3588  
 Asp Gln Thr Ser Tyr Ile Thr Lys Thr Val Glu Phe Thr Pro Ser Thr

1120 1125 1130

GAG CAA GTT TGG ATT GAC ATG AGT GAG ACC GAA GTG TAT TCA ACA TAGAAAG3640  
 Glu Gln Val Trp Ile Asp Met Ser Glu Thr Glu Val Tyr Ser Thr

1135 1140 1145

TGTAGAACTC GTGTTAGAAG AAGAGTAATC ATAGTTTCCC TCCAGATAGA AGGTTGATCT 3700  
 GGAGGTTTTC TTATAGAGAG AGTACTATGA ATCAAATGTT TGATGAATGC GTTGCGAGCG 3760  
 GTTTATCTCA AATATCAACG GTACAAGGTT TATAAAT 3797

【0058】配列番号 : 2

配列の長さ : 2299

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源

生物名 : パチルス・チューリングエンシス : セロバール・ヤポネンシス (Bacillus thuringiensis serovar japonensis)

株名 : ブイブイ (Buibui)

AATTCTAATG ACACAGTAGA ATATTTTAA AATAAAGATG GAAGGGGGAA TATGAAAAAA 60  
 ATATAATCAT AAGAGTCATA CAAAAAGATT GTATGTAAA AAAAAAAT CCTGTAGGAA 120  
 TAGGGGTTTA AAAGCAATCA TTGAAAAGA TAGTTATATT AAATTGTATG TATAGGGGGA 180  
 AAAAAG ATG AGT CCA AAT AAT CAA AAT GAG TAT GAA ATT ATA GAT GCT 228

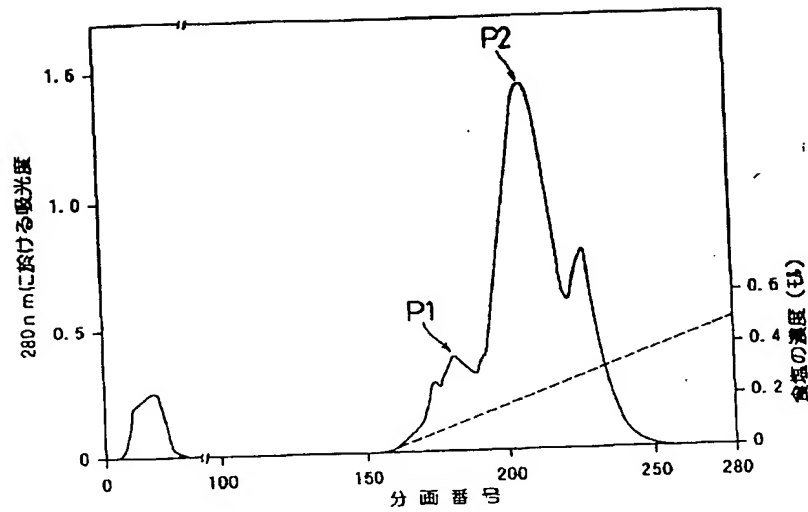
25	Met Ser Pro Asn Asn Gln Asn Glu Tyr Glu Ile Ile Asp Ala	26
1	5	10
TTA TCA CCC ACT TCT GTA TCC GAT AAT TCT ATT AGA TAT CCT TTA GCA	276	
Leu Ser Pro Thr Ser Val Ser Asp Asn Ser Ile Arg Tyr Pro Leu Ala		
15	20	25
AAC GAT CAA ACG AAC ACA TTA CAA AAC ATG AAT TAT AAA GAT TAT CTG	324	
Asn Asp Gln Thr Asn Thr Leu Gln Asn Met Asn Tyr Lys Asp Tyr Leu		
35	40	45
AAA ATG ACC GAA TCA ACA AAT GCT GAA TTG TCT CGA AAT CCC GGG ACA	372	
Lys Met Thr Glu Ser Thr Asn Ala Glu Leu Ser Arg Asn Pro Gly Thr		
50	55	60
TTT ATT AGT GCG CAG GAT GCG GTT GGA ACT GGA ATT GAT ATT GTT AGT	420	
Phe Ile Ser Ala Gln Asp Ala Val Gly Thr Gly Ile Asp Ile Val Ser		
65	70	75
ACT ATA ATA AGT GGT TTA GGG ATT CCA GTG CTT GGG GAA GTC TTC TCA	468	
Thr Ile Ile Ser Gly Leu Gly Ile Pro Val Leu Gly Glu Val Phe Ser		
80	85	90
ATT CTG GGT TCA TTA ATT GGC TTA TTG TGG CCG TCA AAT AAT GAA AAT	516	
Ile Leu Gly Ser Leu Ile Gly Leu Leu Trp Pro Ser Asn Asn Glu Asn		
95	100	105
GTA TGG CAA ATA TTT ATG AAT CGA GCG GAA GAG CTA ATT GAT CAA AAA	564	
Val Trp Gln Ile Phe Met Asn Arg Val Glu Glu Leu Ile Asp Gln Lys		
115	120	125
ATA TTA GAT TCT GTA AGA TCA AGA GCC ATT GCA GAT TTA GCT AAT TCT	612	
Ile Leu Asp Ser Val Arg Ser Arg Ala Ile Ala Asp Leu Ala Asn Ser		
130	135	140
AGA ATA GCT GTA GAG TAC TAT CAA AAT GCA CTT GAA GAC TGG AGA AAA	660	
Arg Ile Ala Val Glu Tyr Tyr Gln Asn Ala Leu Glu Asp Trp Arg Lys		
145	150	155
AAC CCA CAC AGT ACA CGA AGC GCA GCA CTT GTA AAG GAA AGA TTT GGA	708	
Asn Pro His Ser Thr Arg Ser Ala Ala Leu Val Lys Glu Arg Phe Gly		
160	165	170
AAT GCA GAA GCA ATT TTA CGT ACT AAC ATG GGT TCA TTT TCT CAA ACG	756	
Asn Ala Glu Ala Ile Leu Arg Thr Asn Met Gly Ser Phe Ser Gln Thr		
175	180	185
AAT TAT GAG ACT CCA CTC TTA CCC ACA TAT GCA CAG GCC GCC TCT CTG	804	
Asn Tyr Glu Thr Pro Leu Leu Pro Thr Tyr Ala Gln Ala Ala Ser Leu		
195	200	205
CAT TTG CTT GTA ATG AGG GAT GTT CAA ATT TAC GGG AAG GAA TGG GGA	852	
His Leu Leu Val Met Arg Asp Val Gln Ile Tyr Gly Lys Glu Trp Gly		
210	215	220
TAT CCT CAA AAT GAT ATT GAC CTA TTT TAT AAA GAA CAA GTA TCT TAT	900	
Tyr Pro Gln Asn Asp Ile Asp Leu Phe Tyr Lys Glu Gln Val Ser Tyr		
225	230	235
ACG GCT AGA TAT TCC GAT CAT TGC GTC CAA TGG TAC AAT GCT GGT TTA	948	
Thr Ala Arg Tyr Ser Asp His Cys Val Gln Trp Tyr Asn Ala Gly Leu		
240	245	250
AAT AAA TTA AGA GGA ACG GGT GCT AAG CAA TGG GTG GAT TAT AAT CGT	996	
Asn Lys Leu Arg Gly Thr Gly Ala Lys Gln Trp Val Asp Tyr Asn Arg		
255	260	265
		270

27	28
TTC CGA AGA GAA ATG AAT GTG ATG GTA TTG GAT CTA GTT GCA TTA TTT	1044
Phe Arg Arg Glu Met Asn Val Met Val Leu Asp Leu Val Ala Leu Phe	
275 280 285	
CCA AAC TAC GAT GCG CGT ATA TAT CCA CTG GAA ACA AAT GCA GAA CTT	1092
Pro Asn Tyr Asp Ala Arg Ile Tyr Pro Leu Glu Thr Asn Ala Glu Leu	
290 295 300	
ACA AGA GAA ATT TTC ACA GAT CCT GTT GGA AGT TAC GTA ACT GGA CAA	1140
Thr Arg Glu Ile Phe Thr Asp Pro Val Gly Ser Tyr Val Thr Gly Gln	
305 310 315	
TCG AGT ACC CTT ATA TCT TGG TAC GAT ATG ATT CCA GCA GCT CTT CCT	1188
Ser Ser Thr Leu Ile Ser Trp Tyr Asp Met Ile Pro Ala Ala Leu Pro	
320 325 330	
TCA TTT TCA ACG CTC GAG AAC CTA CTT AGA AAA CCT GAT TTC TTT ACT	1236
Ser Phe Ser Thr Leu Glu Asn Leu Leu Arg Lys Pro Asp Phe Phe Thr	
335 340 345 350	
TTG CTG CAA GAA ATT AGA ATG TAT ACA AGT TTT AGA CAA AAC GGT ACG	1284
Leu Leu Gln Glu Ile Arg Met Tyr Thr Ser Phe Arg Glu Asn Gly Thr	
355 360 365	
ATT GAA TAT TAT AAT TAT TGG GGA GGA CAA AGG TTA ACC CTT TCT TAT	1332
Ile Gln Tyr Tyr Val Tyr Trp Gly Gly Glu Arg Leu Phe Leu Ser Tyr	
370 375 380	
ATC TAT GGT TCC TCA TTC AAT AAA TAT AGT GGG GTT CTT GCG GGT GCT	1380
Ile Tyr Gly Ser Ser Phe Asn Lys Tyr Ser Gly Val Leu Ala Gly Ala	
385 390 395	
GAG GAT ATT ATT CCT GTG GGT CAA AAT GAT ATT TAC AGA GTT GTA TGG	1428
Glu Asp Ile Ile Pro Val Gly Gln Asn Asp Ile Tyr Arg Val Val Trp	
400 405 410	
ACT TAT ATA GGA AGG TAC ACG AAT AGT CTG CTA GGA GTA AAT CCA GTT	1476
Thr Tyr Ile Gly Arg Tyr Thr Asn Ser Leu Leu Gly Val Asn Pro Val	
415 420 425 430	
ACT TTT TAC TTC AGT AAT AAT ACA CAA AAA ACT TAT TCG AAG CCA AAA	1524
Thr Phe Tyr Phe Ser Asn Asn Thr Gln Lys Thr Tyr Ser Lys Pro Lys	
435 440 445	
CAA TTC GCG GGT GGA ATA AAA ACA ATT GAT TCC GGC GAA GAA TTA ACT	1572
Gln Phe Ala Gly Gly Ile Lys Thr Ile Asp Ser Gly Glu Glu Leu Thr	
450 455 460	
TAC GAA AAT TAT CAA TCT TAT AGT CAC AGG GTA AGT TAC ATT ACA TCT	1620
Tyr Glu Asn Tyr Gln Ser Tyr Ser His Arg Val Ser Tyr Ile Thr Ser	
465 470 475	
TTT GAA ATA AAA AGT ACC GGT GGT ACA GTA TTA GGA GTA GTT CCT ATA	1668
Phe Glu Ile Lys Ser Thr Gly Gly Thr Val Leu Gly Val Val Pro Ile	
480 485 490	
TTT GGT TGG ACG CAT AGT AGT GCC AGT CGC AAT AAC TTT ATT TAC GCA	1716
Phe Gly Trp Thr His Ser Ser Ala Ser Arg Asn Asn Phe Ile Tyr Ala	
495 500 505 510	
ACA AAA ATC TCA CAA ATC CCA ATC AAT AAA GCA AGT AGA ACT AGC GGT	1764
Thr Lys Ile Ser Gln Ile Pro Ile Asn Lys Ala Ser Arg Thr Ser Gly	
515 520 525	
GGA GCG GTT TGG AAT TTC CAA GAA GGT CTA TAT AAT GGA GGA CCT GTA	1812
Gly Ala Val Trp Asn Phe Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Gly Gly Pro Val	

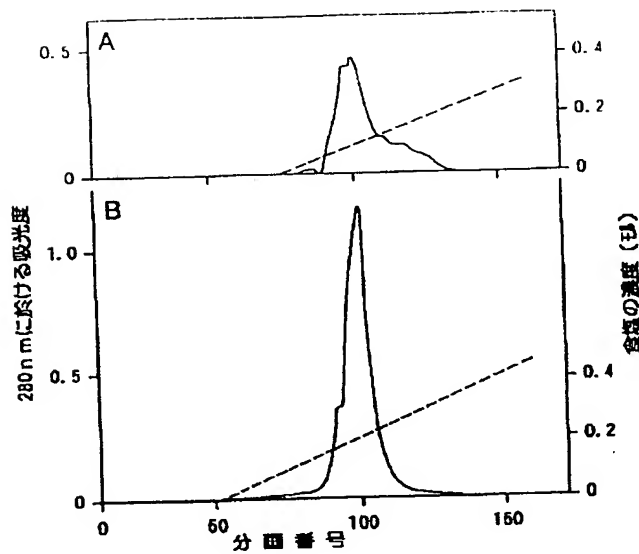


【図2】図1で得られた130kDa, 65kDaタンパク質の再クロマトグラフィー、(A)は65kDa、(B)は130kDa

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>

識別記号

F I

15/32

15/70

15/75

15/78

// C12P 21/02

C 8214-4B

(C12N 1/21

C12R 1:19 )

(C12N 1/21

C12R 1:38 )  
 (C12N 1/21  
 C12R 1:07 )  
 (C12P 21/02  
 C12R 1:19 )  
 (C12P 21/02  
 C12R 1:38 )

8931-4B  
 9281-4B

C12N 15/00  
 5/00  
 D06M 13/18

A  
 C

- (72) 発明者 堀 秀隆  
 茨城県竜ヶ崎市向陽台 5-6 株式会社ク  
 ボタ技術開発研究所つくば研究室内
- (72) 発明者 浅野 昌司  
 茨城県竜ヶ崎市向陽台 5-6 株式会社ク  
 ボタ技術開発研究所つくば研究室内
- (72) 発明者 河杉 忠昭  
 茨城県竜ヶ崎市向陽台 5-6 株式会社ク  
 ボタ技術開発研究所つくば研究室内
- (72) 発明者 佐藤 一  
 東京都小金井市員井北町 3-2-22-37  
 小金井公務員住宅
- (72) 発明者 大庭 道夫  
 福岡県福岡市東区箱崎 5-4-12-1103
- (72) 発明者 岩花 秀典  
 東京都町田市能ヶ谷町 1521-44

C 1 2 R 1:19)  
 (C 1 2 N 1/21  
 C 1 2 R 1:38)  
 (C 1 2 N 1/21  
 C 1 2 R 1:07)  
 (C 1 2 P 21/02  
 C 1 2 R 1:19)  
 (C 1 2 P 21/02  
 C 1 2 R 1:38)

D 0 6 M 13/18

(72)発明者 堀 秀隆  
 茨城県竜ヶ崎市向陽台5-6 株式会社ク  
 ボタ技術開発研究所つくば研究室内  
 (72)発明者 浅野 昌司  
 茨城県竜ヶ崎市向陽台5-6 株式会社ク  
 ボタ技術開発研究所つくば研究室内

(72)発明者 河杉 忠昭  
 茨城県竜ヶ崎市向陽台5-6 株式会社ク  
 ボタ技術開発研究所つくば研究室内  
 (72)発明者 佐藤 令一  
 東京都小金井市貫井北町3-2-22 37  
 小金井公務員住宅  
 (72)発明者 大庭 道夫  
 福岡県福岡市東区箱崎5-4-12 1103  
 (72)発明者 菅花 孝典  
 東京都町田市記(有明)1521 11